



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE
LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum* SHINN)

Amanda Tomaz Batista de Araújo

AREIA - PB

2015

AMANDA TOMAZ BATISTA DE ARAÚJO

**INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE
LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum* SHINN)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em
Agronomia apresentado a Universidade Federal da
Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Campus II,
Areia - PB, como parte das exigências para obtenção
do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Núbia Pereira da Costa

Co-orientadora: Biol. Lucinalva Azevedo dos Santos

AREIA - PB

2015

AMANDA TOMAZ BATISTA DE ARAÚJO

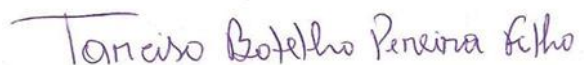
**INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE
LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum* SHINN)**

Definida e Aprovado em: 24 de Fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Núbia Pereira da Costa

Orientadora DCB/CCA-UEPB



Tarciso Botelho Pereira Filho

Examinador CCHSA-UEPB



Lucinalva Azevedo dos Santos

Examinadora CCA-UEPB

AREIA - PB

2015

DEDICATÓRIA

Dedico...

Á Deus que me deu a dádiva da vida e ilumina sempre o meu caminho!

Aos meus Pais, Virgínia Helena e José de Arimatéia por todos os ensinamentos e direcionamentos. Estes serão sempre minha fonte de determinação e agradecimento eterno!

Ao meu irmão Ari Araújo e meu tio Raimundo Antônio pelo incansável apoio, incentivo e compreensão mostrando-me sempre o melhor caminho a ser seguido!

Á Lucinalva Azevedo pela ajuda, paciência, pelos novos conhecimentos que pude com ela obter durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de graduação Camila Alexandre, Maria Amália, Arlison Leite, Heider Santana e Renato Pereira por serem exemplo de determinação e irmandade. Por todo carinho, paciência, compreensão, incentivo e partilha de momentos, dedico!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus pela vida, pelas grandes conquistas e oportunidades concedidas.

A Universidade Federal da Paraíba, especificamente ao Centro de Ciências Agrárias, por ter me proporcionado uma formação profissional.

Aos meus pais, em especial a minha mãe Virgínia Helena Tomaz por sempre estar ao meu lado me incentivando a nunca desistir e seguir em busca dos meus sonhos, como também por todo amor e carinho. A ela meu eterno amor e agradecimento!

Á minha família, base da minha vida, pelo apoio incondicional durante toda minha caminhada.

Á professora Núbia Pereira da Costa pela oportunidade de orientação durante a graduação, pelo incentivo contínuo, confiança, dedicação e apoio. Agradeço por seus ensinamentos, paciência dispensada e seu exemplo como professora e pesquisadora. Sou grata a essa grande profissional e pessoa, que diretamente contribuiu para a minha formação profissional.

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba por todo conhecimento passado durante os cinco anos de curso, os quais foram fundamentais para minha formação profissional.

Á Lucinalva Azevedo pelos ensinamentos e contribuições para realização desse trabalho, por sua palavra amiga de todas as horas, por toda cumplicidade. Agradeço a Deus por ter colocado esse ser de luz em minha vida.

Agradeço á família do Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais em especial as minhas fiéis colegas Camila Alexandre, Bruna Laís Nascimento e Lucinalva Azevedo que estiveram ao meu lado durante esse período de esforços e correria para a conclusão dessa monografia. Pela amizade, convivência, parceria, incentivos e ajuda em todos os momentos dentro e fora da

universidade. Ao Técnico do Laboratório Cosmo e Adriana, pela ajuda prestada em todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus colegas de turma e futuros engenheiros agrônomos: Camila, Maria Amália, Arliston, Heider, Renato, Marciano, Daniel Júnior, Daniel Ferreira, Mileny, Gilmar, Paulinho, Ítalo, Guilherme, Joel, Daniel, Túlio, Rafael, Ruan, Wagner. Lembrarei de vocês em cada detalhe. Todos os momentos estarão para sempre guardados em meu coração!

As minhas primas e amigas de longas datas, Bruna Laís e Rosa Maria por estarem comigo em todos os momentos e pela amizade verdadeira. Meu carinhoso agradecimento!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Percentagem de calos formados em explantes de lisianthus em diferentes concentrações de 2,4-D. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015. 13
- Figura 2.** Efeitos das concentrações de 2,4-D no processo de embriogênese somática em relação à porcentagem de calos embriogênicos de explantes de lisianthus. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015. 14
- Figura 3.** Comprimento longitudinal médio da massa de calos dos explantes de lisianthus em diferentes concentrações de 2,4 – D. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015..... 14
- Figura 4.** Calos embriogênicos obtidos em diferentes concentrações de 2,4- D no meio de cultura aos 42 dias de inoculação de lisianthus: A) T1: 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4- D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP ; B) T2: 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4- D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; C) T3: 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4- D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; D) T4: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4- D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; E) T5: 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4- D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; F) T6: 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4- D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP. 15
- Figura 5.** Textura e coloração dos calos formados em diferentes concentrações de 2,4 D. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015. 16
- Figura 6.** Diferenças morfológicas quanto á consistência e coloração dos calos formados em explantes de lisianthus a partir de diferentes concentrações de 2,4-D. A) calos friáveis e marrons; B) calos friáveis e amarelo-esverdeados; C) calos friáveis e branco leitoso; D) calos friáveis e amarelo-creme.. 16

Sumário

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Descrição Botânica e Importância Econômica..... | 3 |
| 2.2 Cultura de tecidos vegetais | 4 |
| 2.3 Meios de Cultura | 6 |
| 2.3.1 Reguladores de crescimento vegetais..... | 7 |
| 2.4 Embriogênese Somática | 9 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 10 |
| 3.1 Local de condução da pesquisa e obtenção dos propágulos..... | 10 |
| 3.2 Indução de calos | 10 |
| 3.3 Parâmetros avaliados | 11 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 11 |
| 4.1 Indução de calos | 11 |
| 5. CONCLUSÕES | 17 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |

ARAÚJO, A. T. B. DE. **INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE LISIANTHUS** (*Eustoma grandiflorum* SHINN). 2015. 38 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. Orientadora: Núbia Pereira da Costa.

RESUMO

O lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN.) pertencente à família Gentianaceae, é uma planta originária da América do Norte, nativa do norte do México e sul dos Estados Unidos. O atual interesse da produção desta espécie ocorre principalmente pela grande diversidade de cores de suas flores, alta produtividade e um longo período pós-colheita. A indução de calos é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas. O 2,4-D é a auxina mais utilizada na indução à embriogênese somática de muitas espécies. Concentrações inadequadas desse regulador de crescimento podem limitar a formação dos calos embriogênicos e, conseqüentemente, de embriões. Este trabalho teve por objetivo testar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D, na indução de calos em explantes foliares de *Eustoma grandiflorum*, visando obter a embriogênese somática. Segmentos foliares de lisianthus foram fragmentados em explantes de um cm², os quais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio em meio de cultivo MS acrescido de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹) e benzilaminopurina (BAP) na concentração de (0,05 mg.L⁻¹) em todos os tratamentos, num total de 6 tratamentos com 15 repetições. A percentagem de explantes que formaram calos foi avaliada aos 35 dias de inoculados, e aos 42 dias foi avaliada a morfogênese dos calos quanto à consistência, coloração, comprimento longitudinal médio da massa de calo e percentagem de calos embriogênicos. A maior formação de calos em explantes de *Eustoma grandiflorum* ocorre nas concentrações de 1,0 a 3,0 mg.L⁻¹ em presença de 2,4-D associado ao BAP; O meio de cultura MS suplementado com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D é eficiente na formação de calos embriogênicos em explantes de *Eustoma grandiflorum*; Todas as concentrações de 2,4-D associados a 0,05 mg.L⁻¹ de BAP ocasionaram um maior número de calos friáveis e com coloração amarelo creme; É considerável a presença de auxinas endógenas em *Eustoma grandiflorum*.

Palavras chave: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, calos embriogênicos, ornamental.

ARAÚJO, A. T. B. DE. **CALLUS INDUCTION IN LEAF EXPLANTS LISIANTHUS** (*Eustoma grandiflorum* SHINN). 2015. 38 p. Monograph (Undergraduate Degree in Agronomy) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. Advisor: Núbia Pereira da Costa.

ABSTRACT

The lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN.) belongs to the Gentianaceae family, is a native North American plant, native northern Mexico and southern United States. The current interest of this species occurs primarily by the wide variety of colors of your flowers, high productivity and a long post-harvest period. Induction of callus is a basic step for the development of plant mass propagation systems. 2,4-D is the most used in auxin induction of somatic embryogenesis of many species. Inadequate concentrations of growth regulator may limit the formation of embryogenic callus and therefore embryos. This study aimed to test the influence of different concentrations of 2,4-D, the callus induction in leaf explants of *Eustoma grandiflorum*, to obtain somatic embryogenesis. Lisianthus leaf segments were fragmented on a cm² explants which were inoculated individually in test tubes on MS medium plus 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) at the concentrations (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 and 5,0 mg.L⁻¹) and benzylaminopurine (BAP) at a concentration of (0,05 mg L⁻¹) under all treatments a total of 6 treatments with 15 repetitions. The percentage of callus from explants was assessed after 35 days, inoculated and after 42 days were evaluated for callus morphogenesis as consistency, color, median longitudinal length of the callus mass and percentage of embryogenic callus. The higher callus formation in explants of *Eustoma grandiflorum* occurs at concentrations of 1.0 to 3.0 mg l⁻¹ in the presence of 2,4-D associated with the BAP; The MS medium supplemented with 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D is effective in the formation of embryogenic callus from explants on *Eustoma grandiflorum*; All concentrations of 2,4-D associated to 0.05 mg.L⁻¹ BAP caused a greater number of callus and friable with cream yellow color; There is considerable presence of endogenous auxin in *Eustoma grandiflorum*.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic, somatic embryogenesis, ornamental.

1. INTRODUÇÃO

O lisianthus, (*Eustoma grandiflorum* SHINN) é uma planta ornamental da família Gentianaceae pertencente ao gênero Eustoma, originária do norte do México e sul dos Estados Unidos, sendo cultivada principalmente como flor de corte para ornamentação, devido as suas variedades híbridas possuírem flores de distintas cores. Tem vida de vaso relativamente longa, levando cerca de 12 dias em condições ideais após a colheita para alcançar a senescência (LEVERENTZ et al., 2002; WAGSTAFF et al., 2001). É cultivado em grande escala na Holanda, Japão, Israel e Estados Unidos. No Brasil foi introduzida na década de 80 e começou a destacar-se economicamente a partir dos anos 90, despertando grande interesse entre produtores e consumidores (SALVADOR, 2000; BACKES et al., 2007). No Brasil, seu cultivo ainda é incipiente, mas promissor. Portanto, existe uma tendência ao aumento de sua produção por ser uma espécie vistosa, com boa duração pós-colheita, preço de comercialização aceitável, além de ser relativamente nova no mercado de flores quando comparada a outras culturas tradicionais (LEÓN et al., 2011). Seu cultivo em vaso ainda é menos popular, porém, as variedades de vaso podem apresentar uma boa aceitação no mercado.

A floricultura comercial é um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro contemporâneo (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). No setor internacional da floricultura, a cultura de tecidos movimenta em torno de US\$15 bilhões de dólares por ano, sendo que, países como Alemanha, Holanda, Índia, Inglaterra e USA, fazem dela um importante instrumento de propagação vegetativa, visando inserir-se tanto no mercado nacional como no mercado internacional com um extenso volume de negócios (CID, 2007).

As técnicas de cultura de tecidos, entre as quais a micropropagação, representa uma alternativa para contornar obstáculos que restringem a propagação convencional de várias espécies (TORRES; CALDAS, 1998). A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas que tem como princípio o isolamento de um explante (célula, tecido ou órgão) e seu cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (COSTA, 2006). Esta técnica envolve a seleção da fonte de explante, desinfestação dos tecidos e a introdução em ambiente asséptico em meios de crescimento, enraizamento e aclimatização (VASIL, 1994).

A propagação por meio de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta. Na via indireta, há formação de calos com retorno ao nível meristemático das células diferenciadas e, em seguida, a transformação em novos brotos e plantas, sendo então considerada uma potencial forma de propagação em massa (LANDA et al., 2000).

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004). Tem sido sugerido que as auxinas são necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais expressando a totipotência das células competentes. Segundo Jiménez (2005), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina sintética mais utilizada na indução à embriogênese somática de várias espécies. Sendo o regulador de crescimento utilizado na maioria dos estudos de cultura de células e tecidos embriogênicos (FEHÉR et al., 2003). Altas concentrações dessa auxina alteram, rapidamente, o metabolismo das células dos explantes, resultando no desenvolvimento de calos (DUDITS et al., 1995).

A indução de calos pode ser a primeira etapa para a propagação em larga escala desta espécie via cultura de tecidos vegetais, o que seria de grande interesse para subsidiar programas de melhoramento.

O objetivo no presente trabalho foi testar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D, na indução de calos em explantes foliares de *Eustoma grandiflorum*, visando obter a embriogênese somática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descrição Botânica e Importância Econômica

O *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* SHINN.) pertencente à família Gentianaceae, terceira maior família da ordem Gentianales, é uma planta originária da América do Norte, nativa do norte do México e sul dos Estados Unidos. É representada por, aproximadamente, 70 gêneros, sendo 25 deles encontrados no Brasil. Essa espécie é encontrada em maior proporção nos estados do Texas, Arizona, Colorado e no Novo México (KATZ, 2001). O atual interesse da produção desta espécie ocorre principalmente pela grande diversidade de cores de suas flores e alta produtividade (FOX, 1998). No Brasil, apesar de ter sido introduzida no final da década de 80, a espécie começou a se destacar economicamente somente a partir da década de 90 (SALVADOR, 2000; CAMARGO et al., 2004).

Trata-se de uma herbácea bienal, cultivada como anual, de caule ereto, com folhas ovais e oblongas, formando flores com um grande atrativo ornamental. As flores, simples ou dobradas, são grandes e bastante duráveis. Tais características têm atraído o mercado consumidor, tornando-a uma espécie importante para o mercado mundial de flores (GRIESBACHET et al., 1988; ROH et al., 1989). Os floristas têm dado preferência ao *lisianthus* para a confecção de arranjos decorativos, devido à durabilidade de suas flores e ao comprimento e firmeza de suas hastes (HANKINS, 2004; BACKES, 2005).

Em geral, apresentam folhas opostas, inteiras, sem estípulas. As flores são bastante vistosas, pentâmeras, de simetria radial, hermafroditas, diclamídeas. Sépalas livres ou soldadas e corola fortemente torcida no botão. Androceu isômero e alterno com as pétalas. Ovário súpero bicarpelar e bilocular ou unilocular, com muitos óvulos (JOLY, 2002).

Pode apresentar três cores básicas: azul, rosa e branca (HALEVY; KOFRANEK, 1984), sendo que a preferência do mercado consumidor varia quanto à coloração e a região. As cultivares são divididas em flores simples e dobradas, sendo que o mercado europeu e o japonês preferem as flores simples, já o americano e o brasileiro, as flores dobradas. A cultivar ‘Echo’ é a mais comum no Brasil (CORR; KATZ, 1997).

O ciclo da cultura é longo, aproximadamente seis meses, divididos em dois estádios desde a semeadura até o florescimento. O primeiro estágio tem início com a germinação e sua duração média de três meses. Durante esse estágio, as plantas crescem em forma de roseta, formando somente quatro pares de folhas verdadeiras. O segundo estágio envolve a alongação da haste finalizando com o florescimento (GRIESBACHET et al., 1988). Algumas cultivares de *lisianthus* apresentam ciclo de cultivo precoce, fato que minimiza o tempo total de produção, sendo elas: Echo Champagne, Ávila Blue Rim, Echo Pink e Mariachi Pure White (BACKES et al., 2004).

No Brasil, o fato da expansão das importações de flores, justifica-se pelo conjunto de indicadores favoráveis observados na economia nacional relacionados com os níveis de emprego, ocupação e renda, além da estabilidade econômica do país, que vem sustentando um consumo espaçoso e mais diversificado dessas mercadorias (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

Desde 2006 o segmento de flores no Brasil tem registrado altas de 8% a 15% em volume e de 15% a 17% em valor. Em relação aos empregos diretos foram 206 mil. Dos quais 102.000 (49,5%) relativos à produção, 6.400 (3,1%) relacionados à distribuição, 82.000 (39,7%) no varejo e 15.600 (7,7%) em outras funções. O faturamento do mercado de flores e plantas ornamentais em 2012 no país foi de R\$ 4,8 bilhões, com cerca de 13,800 mil hectares de área cultivada (IBRAFLOR, 2013). Para o ano de 2014 o IBRAFLOR (Instituto Brasileiro de Floricultura) estimou um crescimento de 8 a 10%. Em 2013 o Brasil não exportou rosas, cravos ou orquídeas cortadas, enquanto outras flores frescas e seus botões incluindo *lisianthus*, *gérberas*, *lírios*, *antúrios*, *abacaxis* ornamentais e outras flores tropicais foram exportadas somando participação relativa de apenas 0,58% (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014). Apesar da exportação de flores de corte ter enfraquecido nos últimos anos, o mercado interno brasileiro tem submergido a produção nacional.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas que tem como princípio o isolamento de um explante (célula, tecido ou um órgão) e seu cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (COSTA, 2006). O objetivo é obter novas plantas idênticas à original, realizar-se assim, uma clonagem

vegetal que é determinada como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, cultivando-se o genótipo idêntico aquele do ancestral comum (TORRES et al., 2000).

Esta prática consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas adequadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (GIACOMETTI, 1990). A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt em 1902, onde enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES et al., 2006). O cultivo *in vitro* permite ainda aprimorar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura, etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas geneticamente superiores, saudáveis e vigorosas, que podem ser multiplicadas em massa (ALVES et al., 2012).

A micropropagação de plantas através da cultura de tecidos tem sido realizada pelo emprego das culturas de calos, órgãos, células e protoplastos (HIGASHI et al., 2000). A formação de calos a partir de um explante é denominada calogênese (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004). O calo consiste em uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede (FLORES et al., 1998). É um tecido amorfo e desorganizado, formado pela intensa atividade de células vegetais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), que depois de formado, pode dar origem ou não a diferentes órgãos ou embriões.

Para que haja a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante (FLORES et al., 2000). Procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que exponham uma maior capacidade de expressar sua totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Em geral, induz-se a formação de calos, a partir de explantes cultivados em meio de cultura contendo auxina, ou com alta relação auxina/citocinina (RIOS, 2004). Segundo Cerqueira et al. (2002), os fatores que interferem na calogênese são: tamanho do explante, composição dos meios de cultura, reguladores vegetais exógenos, órgão fornecedor do explante e genótipo da planta doadora. A cultura de calos, uma vez estabelecida, pode ser multiplicada por meio da sucessão de subculturas, como também sendo mantida na

condição *in vitro* por períodos que variam dependendo de cada espécie (RODRIGUES et al., 2010).

A cultura de calo é uma ferramenta biotecnológica extremamente importante. Na embriogênese somática indireta, a calogênese é uma etapa essencial, considerada uma forma potencial de propagação em massa (FRANCO et al., 2006; LANDA et al., 2000). A calogênese se divide em três etapas básicas: indução, divisão celular e diferenciação (STAFFORD; WARREN, 1991). Na terceira fase, a diferenciação celular, é onde ocorre a formação dos produtos do metabolismo secundário (AITCHISON, 1977).

Estudos de propagação para formação de calos devem ser desenvolvidos para determinar as condições de cultura que os explantes precisam para sobreviver e crescer (SIQUEIRA; INOUE, 1992). O cultivo de calos pode ser empregado para estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, como também para obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos para obtenção de sementes sintética (LANDA et al., 2000). A produção de sementes sintéticas tem sido concernida em diversas espécies, tais como *Solanum tuberosum* (NYENDE et al., 2005), *Arnebia euchroma* (MANJIKHOLA, 2005), *Piper hispidinervum* (GUEDES et al., 2007) e *Spartina alterniflora* (UTOMO et al., 2008).

2.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura geralmente são compostos por água, soluções de micro e macronutrientes, carboidratos, vitaminas, reguladores vegetais e outras substâncias necessárias para a nutrição da planta cultivada (CALDAS, 1998). Podem ser líquidos ou sólidos (adicionando-se Ágar ou outro agente geleificante), de acordo com o protocolo para o princípio de cultivo (GUERRA; NODARI, 2006). Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam o padrão do desenvolvimento “*in vitro*”, em grande parte (TORRES et al., 1998).

O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio e múltiplos componentes, que variam em função da espécie vegetal e da origem do explante. É constituído de componentes essenciais e adicionais. Os

essenciais incluem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, as vitaminas e reguladores de crescimento. Os componentes adicionais abrangem os aminoácidos e amidas, os ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas (GUERRA; NODARI, 2006). Além da composição dos meios de cultura, as condições físicas de inoculação, como a temperatura, umidade, intensidade, qualidade e duração do período de luz, e o próprio genótipo do material vegetal cultivado, influenciam a morfogênese dos tecidos vegetais (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

A composição do meio é fundamentada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas (GUERRA; NODARI, 2006). Portanto, o fator chave da multiplicação é a presença dos reguladores de crescimento vegetal, particularmente citocininas e auxinas (CORDEIRO et al., 2004). As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990).

2.3.1 Reguladores de crescimento vegetais

Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas, não produzidas naturalmente e que apresentam funções similares aos hormônios vegetais. Essas substâncias, quando aplicadas em dosagens controladas, podem estimular inibir ou modificar o desenvolvimento e crescimento das plantas. Existem seis classes de hormônios/reguladores conhecidos: as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o ácido abscísico, o etileno e os brassinoesteroides (TORRES et al., 2000; FREITAS, 2009).

As auxinas são hormônios/reguladores responsáveis pelo alongamento celular e por favorecer a calogênese e a rizogênese em tecidos vegetais. Segundo Gueye et al. (2009), a resposta evidenciada pelo explante não depende apenas de suas características, sendo de extrema importância as influências do tipo e da dosagem do regulador vegetal utilizado no meio de cultura.

Dentre as auxinas mais conhecidas estão o Ácido 3-Indolilacético (AIA), o Ácido α -naftalenoacético (ANA), o Ácido indolbutírico (AIB) e o Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4- D). O AIA é considerado uma auxina relativamente “fraca”, pois é facilmente degradada pela luz e por microorganismos, tornando-se ligeiramente indisponível para o metabolismo celular, diminuindo sua eficiência sobre os tecidos em cultura. Enquanto o AIB é a auxina mais utilizada como agente indutor de

enraizamento. O ANA é uma das auxinas mais utilizadas em cultura de tecidos *in vitro* na indução da rizogênese. Geralmente, o ANA é utilizado em experimentos como categoria de comparação com outras auxinas, podendo apresentar resultados melhores que estas, dependendo das espécies trabalhadas e concentrações utilizadas (CALDAS, 1998; FREITAS, 2009).

O 2,4-D apresenta grande influência sobre a indução da formação de calos em culturas *in vitro*, sendo este regulador normalmente vinculado a protocolos de micropropagação por vias indiretas. O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma das auxinas mais frequentemente utilizadas em cultura de tecidos, para indução do calo, e em culturas em suspensão (GASPAR et al., 1996). A indução da calogênese acontece em meio com altas concentrações de auxinas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Nos processos embriogênicos, aqueles explantes que são cultivados na ausência de 2,4-D não se desenvolvem, ficam amarronzados e necrosam totalmente dentro de poucos dias de cultivo (TIEL et al., 2006; SANI; MUSTAPHA, 2010).

As citocininas são substâncias que apresentam o papel de induzir a expansão celular por meio da multiplicação de células vegetais. Entre as citocininas mais conhecidas estão a 6-Benzilaminopurina (BAP) e a Cinetina (KIN). O KIN possibilita o crescimento celular sem brotação, enquanto o BAP é um forte indutor de brotação (FREITAS, 2009; ASMAR, 2011).

As auxinas em geral, são utilizadas quando a intenção for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular, a formação de calos e raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão. Já as citocininas são comumente empregadas para estimular o desenvolvimento e crescimento de brotações múltiplas (PIERIK, 1990; GEORGE, et al., 2008).

Depende de cada pesquisador a escolha das citocininas e das auxinas nos cultivos *in vitro*, porém mesmo com escolhas diferentes, podem-se obter resultados similares. O estabelecimento e multiplicação de brotos podem ser promovidos por uma citocinina sem a adição de auxinas. Experimentos demonstraram que as auxinas podem ser desnecessárias para algumas espécies e podem reduzir a capacidade dos brotos de enraizar. Já a adição de mais de uma citocinina pode melhorar a qualidade dos brotos ou aumentar a produção (GEORGE, et al., 2008).

Segundo Schwengber et al. (1999), a utilização de reguladores de crescimento é indispensável para obter sucesso na multiplicação “*in vitro*”. É necessário um adequado balanço entre auxinas e citocinas para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas “*in vitro*”. Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores as das citocininas, mantendo o balanço auxina/citocinina menor que um (PIERIK, 1990). Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre formação de raízes. Em condição contraposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são semelhantes, é produzida massa de calo (KRIKORIAN, 1995).

2.4 Embriogênese Somática

A embriogênese somática é uma ferramenta fundamental para o melhoramento de espécies vegetais de importância comercial (GONZÁLEZ et al., 2012). Foi desenvolvida com o intuito de propiciar uma rápida multiplicação de inúmeras espécies, e passou a ser utilizada como uma técnica de pesquisa e interesse industrial (PINTO et al., 2011). Atualmente, é uma das técnicas de maior importância na cultura de tecidos vegetais e pode ser compreendida como um conjunto de etapas pelas quais células somáticas diferenciam-se em embriões.

A embriogênese somática consiste na formação de embriões a partir de células somáticas, diferentemente da formação dos embriões zigóticos, formados na fusão dos gametas (GEORGE, 1996; HARTMANN et al., 2002). Para que ocorra a embriogênese somática é necessário que a célula ou o tecido vegetal sofra uma indução, já que as células somáticas não são naturalmente embriogênicas (NAMASIVAYAM, 2007). Portanto, aquelas células que se mostram sensíveis aos fatores de indução e capazes de desenvolver a embriogênese somática, são as que se formam os embriões (GAJ, 2004).

O processo que ocorre com o explante, se assemelha morfológicamente ao que ocorre com embriões zigóticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), sendo empregado para propagação vegetativa em larga escala e para estudos de desenvolvimento embrionário. Esta metodologia vem sendo utilizada para a obtenção de plantas transgênicas (PRAKASH; VARADARAJAN, 1992) e sementes sintéticas (SCHULTHEIS et al., 1990).

O processo de embriogênese somática é caracterizado quando células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas. Dois padrões de embriogênese somática podem ser distinguidos *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo, denominado modelo indireto, ocorre quando os embriões se formam a partir de um calo, que apresenta diferentes estádios de diferenciação (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

A principal vantagem da embriogênese somática é que a regeneração de embriões somáticos pode ocorrer a partir de células individuais. Além disso, em muitas plantas em que esta técnica foi aplicada, uma embriogênese secundária, um fenômeno em que novos embriões surgem a partir de embriões somáticos, foi muitas vezes observado (MOURA et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução da pesquisa e obtenção dos propágulos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Biológicas - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (DCB/CCA/UFPB). Para os ensaios de micropropagação e indução de calos foram utilizadas como fonte de explantes segmentos foliares de plântulas de *lisianthus* de primeiro subcultivo mantidas *in vitro* em condições de sala de crescimento no laboratório.

3.2 Indução de calos

Utilizaram-se explantes provenientes de folhas de *lisianthus* mantidas *in vitro* em sala de crescimento. Em câmara de fluxo laminar, com auxílio de pinça e bisturi os segmentos foliares foram fragmentados em explantes de um cm², os quais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 20,0 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7,0g.L⁻¹ de ágar, acrescido de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹) associadas a benzilaminopurina (BAP) na concentração de

0,05 mg.L⁻¹, que constituíram os tratamentos. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação os tubos foram fechados com tampa de papel alumínio e vedados com filme plástico PVC. O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, na ausência de luz por um período de 35 dias. Após esse período os explantes foram transferidos para meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 20,0 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7,0 g.L⁻¹ de ágar, sem a presença de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram transferidos e os tratamentos foram mantidos na presença de luz com fotoperíodo de 16 horas, em sala de crescimento a 25±2° C, por um período de quatro dias, sendo transferido, novamente, para meio MS por mais 4 dias.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e 15 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância com base na significância do teste F foram testados os modelos linear e quadrático para avaliar as concentrações de 2,4-D utilizando o Programa Computacional SAS System.

3.3 Parâmetros avaliados

Após 35 dias de cultivo foi avaliada a percentagem de explantes que formaram calos, e aos 42 dias foi avaliada a morfogênese dos calos quanto à consistência, coloração, comprimento longitudinal médio da massa de calo e percentagem de calos embriogênicos de cada tratamento. A consistência, coloração e identificação de regiões embriogênicas nos calos foram realizadas através de observações visuais com auxílio de lupa PHYSIS[®] e microscópio óptico KOZ-002-12[®] acoplados com câmera MEM1300[®]. O comprimento longitudinal médio da massa de calo foi determinado com paquímetro digital KINGTOOLS[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de calos

As respostas morfogenéticas começaram a ser visualizadas aos 14 dias de indução, com o início de formação de calos. Em nenhum dos tratamentos houve a oxidação dos calos e continuaram a se desenvolver visivelmente. Aos 35 dias de

inoculação, todos os tratamentos apresentaram formação de calos, os quais variaram em tamanho, textura e potencial morfogênico de acordo com as concentrações hormonais utilizadas. Na propagação dos calos, as diferenças observadas, ocorrem porque os explantes podem variar em sua sensibilidade aos fitoreguladores ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios (KARP,1995).

Todas as concentrações testadas foram eficientes na formação de calos, sendo que as concentrações com 1,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D apresentaram resultados superiores na indução de calos. A concentração de 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D apresentou um maior número de explantes que não proporcionaram respostas, comparando-se com os demais tratamentos, como pode ser observado na figura 1. Os resultados encontrados neste trabalho discordam, em parte, de Grattapaglia & Machado, (1990) e Ammirato (1983), onde descrevem que a indução da calogênese ocorre em meio com altas concentrações de auxinas, uma vez que os resultados comprovaram que mesmo em concentrações baixas a auxina foi capaz de induzir a formação de calos. Salman (2002) obteve 100% de calos desenvolvidos a partir de segmentos foliares de mosquitinho (*Gypsophila paniculata*) em meio suplementado com 2,4-D e BAP. Em seu experimento, a maior taxa de calos foi obtida com a relação auxina/citocinina igual a 0,2 mg.L⁻¹.

Nogueira et al. (2007) trabalhando com calogênese em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) obtiveram melhor indução e proliferação de calos em meio MS suplementado com 4,52 mg. L⁻¹ de 2,4-D. Esses resultados mostram que concentrações maiores da auxina 2,4-D podem ser usadas para a indução da calogênese dependendo da espécie. Portanto, resultados diferentes foram encontrados neste trabalho, onde nas concentrações 1,0 e 2,0 mg. L⁻¹ de 2,4-D foram obtidos os melhores resultados em relação a indução de calos em explantes de lisianthus. É considerável a presença de auxinas endógenas em *Eustoma grandiflorum*, onde o tratamento com ausência de 2,4-D apresentou bons resultados na indução de calos. Este comportamento pode estar relacionado com o fato dos explantes de lisianthus possuírem certa quantidade endógena de hormônios promotores da indução de calos. As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular. O mecanismo do 2,4-D é o efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas

para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada (GEORGE, 1996).

Lima *et al.* (2008), trabalhando com indução de calos em segmentos foliares sangue-de-drago (*Croton urucurana* Baill.), obtiveram resultados onde o uso de BAP isoladamente e a combinação entre ANA e BAP não promoveram calogênese. Já a combinação de 2,4-D e BAP ou TDZ apresentou indução de calos, no entanto a produção máxima de calos ocorreu com o emprego do 2,4-D isoladamente, nas concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹. Oliveira et al. (2006) avaliaram o efeito de BAP e 2,4-D na formação de calos em explantes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e observaram efeitos positivos de 2,4-D isoladamente ou em associação com o BAP. Por outro lado, BAP isoladamente não resultou em calogênese.

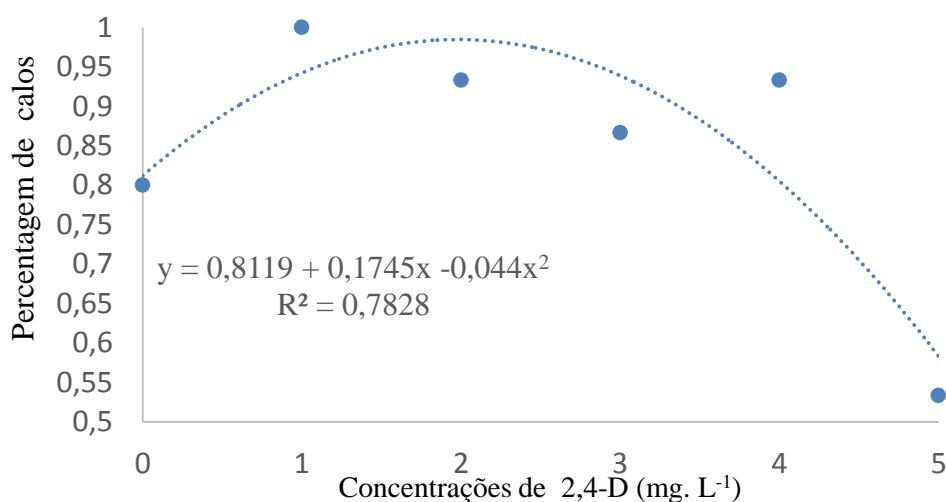


Figura 1. Percentagem de calos formados em explantes de lisianthus em diferentes concentrações de 2,4-D. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015.

Os reguladores de crescimento testados mostraram-se eficientes para induzir a formação de calos embriogênicos. Após o período de indução de calos aos 42 dias foram realizadas avaliações, através de observações visuais com auxílio de lupa e microscópio acoplados a câmera, do potencial embriogênico dos calos, além da verificação da consistência e coloração dos mesmos. Em todos os tratamentos foram encontrados calos embriogênicos como pode ser observado na figura 2. Os melhores resultados apresentaram-se nas concentrações 1,0 e 2,0 mg. L⁻¹ de 2,4-D. Já na ausência de 2,4-D o percentual de calos embriogênicos foi o menor dos tratamentos. Segundo Tiel et al. (2006) concentrações baixas de 2,4-D induzem a formação de calos

embriogênicos em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). De acordo com Jiménez (2005), o 2,4-D é a auxina mais utilizada na indução à embriogênese somática de muitas espécies. Altas concentrações dessa auxina alteram, rapidamente, o metabolismo das células dos explantes, resultando no desenvolvimento de calos (DUDITS et al., 1995). Vários autores têm evidenciado o efeito positivo do 2,4-D na indução de calos e embriogênese somática (TIEL et al., 2006; SANI; MUSTAPHA, 2010). Nesses estudos tem-se observado variações na recomendação da melhor concentração de 2,4-D a ser utilizada em função da espécie estudada. Na avaliação do comprimento longitudinal médio da massa dos calos determinada com paquímetro digital, não houve efeitos significativos dos tratamentos, podendo ser observado na figura 3. Apresentando o valor médio de 5,0 milímetros.

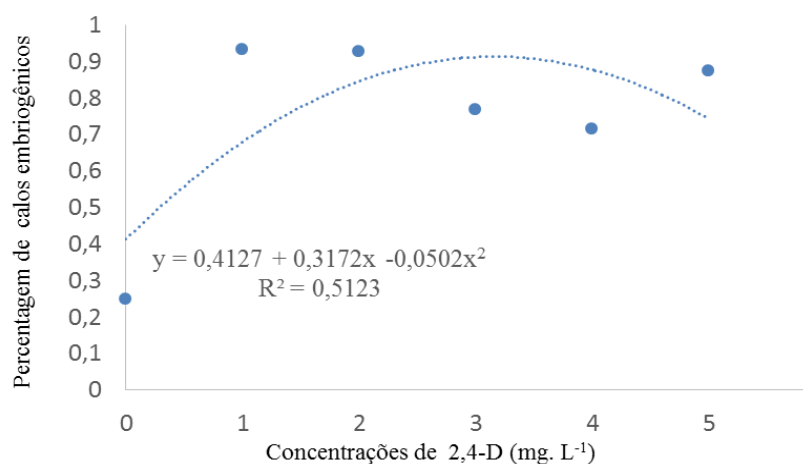


Figura 2. Efeitos das concentrações de 2,4-D no processo de embriogênese somática em relação à porcentagem de calos embriogênicos de explantes de lisianthus. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015.

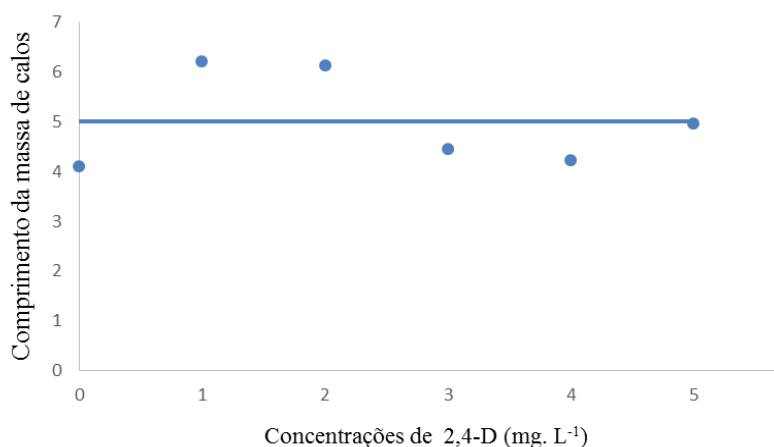


Figura 3. Comprimento longitudinal médio da massa de calos dos explantes de lisianthus em diferentes concentrações de 2,4-D. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015.

Células embriogênicas possuem divisões celulares contínuas que resultam na formação de massas de células embriogênicas, chamadas de aglomerados embriogênicos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; SAVONA et al., 2011). Aglomerados de calos embriogênicos formados nas diferentes concentrações de 2,4-D em explantes de lisianthus podem ser observados na Figura 4.

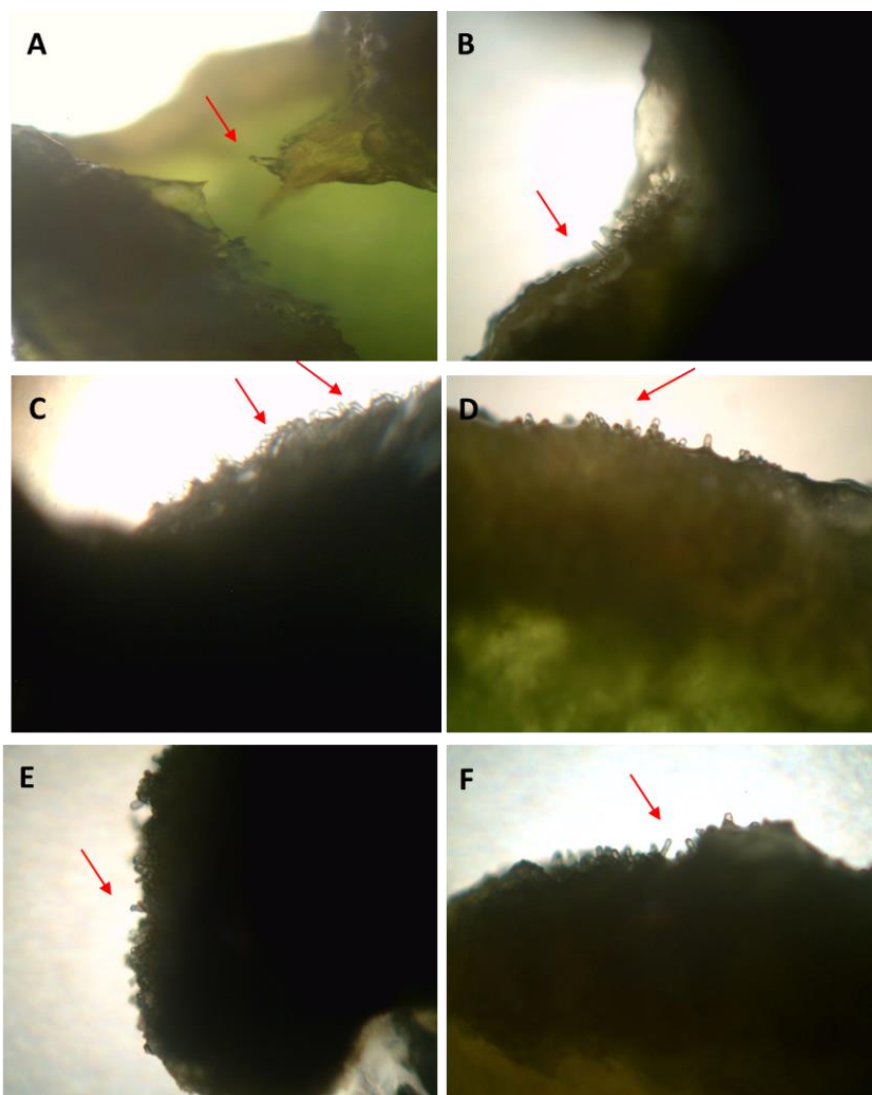


Figura 4. Calos embriogênicos obtidos em diferentes concentrações de 2,4-D no meio de cultura aos 42 dias de inoculação de lisianthus: A) T1: 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; B) T2: 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; C) T3: 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; D) T4: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; E) T5: 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; F) T6: 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP. Fotos: Amanda Tomaz.

Segundo Brunetta et al. (2006), a morfologia e textura do calo é influenciada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, que produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio com alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação for inversa, produz calos de tecido compacto secos e com células pequenas.

Quanto à consistência e coloração, foram visualizados calos friáveis e marrons; friáveis e amarelo-esverdeados; friáveis e amarelo-creme; friáveis e branco leitoso. Sendo que, a maioria dos calos apresentaram-se friáveis e amarelo-creme, como pode ser visualizado da figura 5. Observa-se também, as diferenças morfológicas quanto à textura e coloração dos calos formados a partir de diferentes concentrações de 2,4 D, figura 6.

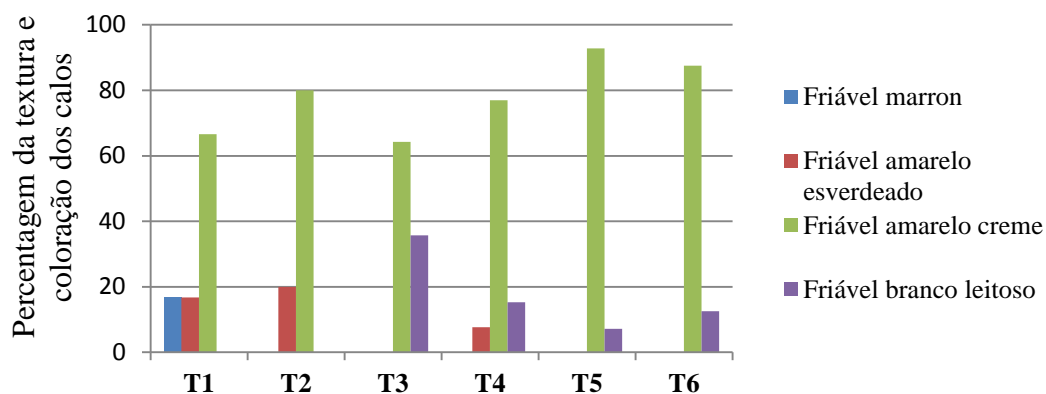


Figura 5. Textura e coloração dos calos formados em diferentes concentrações de 2,4 D. CCA/UFPB, Areia – PB, 2015.

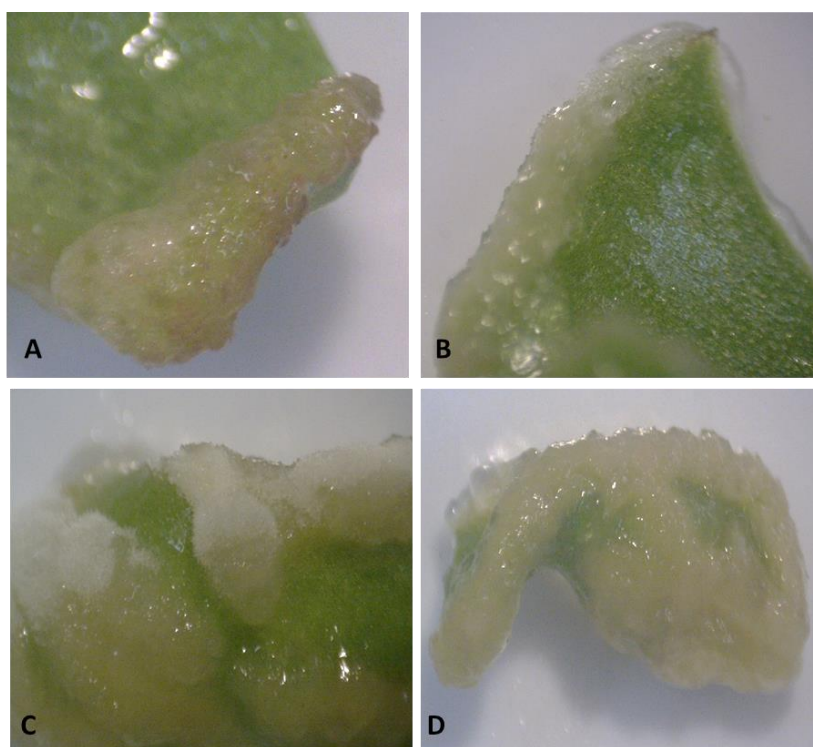


Figura 6. Diferenças morfológicas quanto à consistência e coloração dos calos formados em explantes de lisianthus a partir de diferentes concentrações de 2,4-D. A) calos friáveis e marrons; B) calos friáveis e amarelo-esverdeados; C) calos friáveis e branco leitoso; D) calos friáveis e amarelo-creme. Fotos: Amanda Tomaz.

5. CONCLUSÕES

A maior formação de calos em explantes de *Eustoma grandiflorum* ocorre nas concentrações de 1,0 a 3,0 mg.L⁻¹ em presença de 2,4-D associado ao BAP;

O meio de cultura MS suplementado com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D é eficiente na formação de calos embriogênicos em explantes de *Eustoma grandiflorum*;

Todas as concentrações de 2,4-D associados a 0,05 mg.L⁻¹ de BAP ocasionaram um maior número de calos friáveis e com coloração amarelo creme;

É considerável a presença de auxinas endógenas em *Eustoma grandiflorum*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. **Plant tissue and cell culture**. 2 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications ed.H. E. Street, 1977, p.267-306.

ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORREA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. O.; PAULA, J. C. R.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M. R. A Cultura de Tecidos na Agricultura. In: Jornada Científica 1., 2012, Bambuí-MG. **Anais...** Bambuí-MG: CEFET, 2012. 3 p.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação in vitro de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* l.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 13, especial, p. 533-538, 2011.

BACKES F. A. A. L.; BARBOSA J. G., BACKES R. L. E.; RIBEIRO J. M. O.; MORITA R. M. Produção de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Shinn.) em vaso sob diferentes densidades de plantas. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 27, n. 2, p. 237-241, 2005.

BACKES F. A. A. L.; BARBOSA J. G., CECON P. R., GROSSI J. A. S., BACKES R. L. E.; FINGER F. L. Cultivo hidropônico de lisianto para flor de corte em sistema de fluxo laminar de nutrientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1561-1566, 2007.

BACKES, F. A. A. A. **Cultivo de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (raf.) Shinn.) para corte de flor em sistemas convencional e hidropônico**. Tese doutorado, Viçosa – MG, 2004, 118p.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. de P. Calogênese in vitro em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia Macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scienti Florestalis**, n.71, p.19-24, 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, p. 87-132, 1998.

CALDAS, L.S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. e ALDAS, L S. ed. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.

CAMARGO, M. S.; SHIMIZU, L. K.; SAITO M. A.; KAMEOKA, C. H.; MELLO, S. C.; CARMELLO, Q. A. C. Crescimento e absorção de nutrientes pelo lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivado em solo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 143-146, 2004.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*tridax procumbens l.*) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.26, n.2, p.301-308, mar./abr., 2002.

CID, L. P. B. **Micropropagação de lisianthus, uma alternativa viável para o agronegócio**. 2007. (Artigo em Hypertexto). Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/lisianthus/index.htm>. Acesso em: 25 jan.2015.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. **Efeito de bap sobre a proliferação de brotos in vitro de schizolobium amazonicum huber ex ducke (paricá)**. Cerne, Lavras, v. 10, n. 01, p.118-124, 2004.

CORR, B.; KATZ, P. A grower's guide to lisianthus production. **Floraculture International**, v. 7, p. 16-20, 1997.

COSTA, A.S. **Sustentabilidade da Produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides Cham.*): Micropropagação visando à conservação in vitro**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)- Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). ***In vitro embryogenesis in plants***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, cap. 8, p. 267-308.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FLORES, R.; GOMES, P.R.; FARIA J.T.C.; CENTELLAS, A.Q.; FORTES G.R.L.; PETERS, J.A. Calogênese com Disco Foliar de Morangueiro. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.4, no 1, p. 09-14, 2000.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração in vitro de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**. v.4, n.3, p. 201-205, 1998.

FOX, R.. Lisianthus: a specialty cut flower. **Practical Hydroponics & Greenhouses**: 43-51. 1998.

FRANCO, E. T. H.; GAVIOLI, L. B.; FERREIRA, A. G. In vitro Regeneration of *Didymopanax morototoni*. **Braz. J. Biol.**, 66(2A): 455-462, 2006.

FREITAS, H. B. **Desenvolvimento e hormônios vegetais**. Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2009.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation, Dordrecht**, v.43, n. 1, p. 27-47, 2004.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulator in plant tissue culture. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. **Plant propagation by tissue culture**, 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. V. 1,501 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Exegetics Limited, England, 2 ed., v. 2, p. 619-631, 1996.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p.19-28, 1990.

GONZÁLEZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, C. D.; ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília:ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.

GRIESBACH, R.J.; SEMENIUK P; ROH M; LAWSON RH. Tissue culture in the improvement of Eustoma. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 4, p. 790-791, 1988.

GUEDES, R. S.; COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **Rev. Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.6, p.1005-1011, 2007.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia**. Edição da Steinmacher, 2006, p. 1-48.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999, v. 2, p. 533-568.

GUEYE, B.; SAID-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J. -L.; VERDEIL, J. -L.; BLERVACQ, A. -S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 98:47–58. 2009.

HAINES, R. J. Mass propagation by cuttings, biotechnologies and the capture of genetic gain. In: MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1., 1994, Bordeaux. **Proceedings...** Paris: AFOCEL/ IUFRO, 1994. p.137-150.

HALEVY, A. H; KOFRANEK, A. M. Evaluation of lisianthus as a new flower crop. **HortScience** v. 19, p. 845-847, 1984.

HANKINS, A. **Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), a new species for the cut flower market**. 2004. Disponível em: <www.ext.vt.edu/news/periodicals/commhort/2002-0103.html> Acesso em: 26 jan. 2015.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES Jr., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey, 7 ed., p. 639- 643, 2002.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A. de; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e a sua evolução no Brasil**. Piracicaba: IPEF (Circular Técnica), n. 192, 2000, 14p.

IBRAFLOR. **Dados Gerais do Setor de Floricultura do ano de 2012**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/boletim.php>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional; v. 4. 2002.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira: balanço 2013 e perspectivas para 2014**. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2014/2013_Comercio_Exterior_Floricultura.pdf>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2015.

JUNQUEIRA, A. H; PEETZ, M. da S. **Consumo necessário. Cultivar: Hortaliças e Frutas**, Pelotas, Ed. 67, p.38, 2011.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.295-302, 1995.

KATZ, I. **Fungigação por irrigação localizada e pulverização convencional, para controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) em plantas de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (RAF.) Shinn)**. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Irrigação e Drenagem) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones, 2ª Ed., Davies P. J. (Ed)., **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 774 – 796. 1995.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

LÉON, E. M. S., TOLOSA, M. R. E., GUERRA, C. A .R. Propagación del Lisianthus cv. Azul por esquejes en macetas de turba bajo nebulización, con distintas concentraciones de ácido β -indolbutírico, en el Valle de Azapa. IDESIA (Chile) Volumen 29, Nº 1. Enero – Abril 2011, pp. 99-102.

LEVERENTZ, M.; WAGSTAFF, C.; ROGERS, H.; STEAD, A.; CHANASUT, U.; SILKOWSKI, H.; THOMAS, B.; WEICHERT, H.; FEUSSNER, I.; GRIFFITHS, G. Characterisation of a novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstroemeria peruviana* floral tissue. **Plant Physiology**, v. 130, p. 273-283, 2002.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, Á. A. N. S. Indução de calos em segmentos foliares de sangra d água (*Croton urucurana* Baill.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.

MANJKHOLA, S.; DHAR, U.; JOSHI, M. Organogenesis, embryogenesis and synthetic seed production in *Arbenia euchroma* - A critically endangered medicinal plant of the Himalaya. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.41, p.244–248, May–June 2005.

MOURA, T. L. et al. Organogênese in vitro de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, n. 1, p. 1-8, 2007.

NYENDE, A.B.; SCHITTENHELM, S.; MIX-WAGNER, G.; GREEF, J.M. Yield and canopy development of field grown potato plants derived from synthetic seeds. **Europ. J. Agronomy**, v.22, p.175–184, 2005.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; SOARES, G.A.; SOARES, F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D.O. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p. 366-370, 2007.

OLIVEIRA, A. L.; KIDO, L. M. H.; KIDO, E. A.; ISEPPO, A. M. B. (2006). Efeito de BAP e 2,4D na formação de Calos em Diferentes Explantes de Feijão-caupi. **Embrapa**, 12.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PINTO, G. et al. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, Santa Monica, v. 25, p. 383–392, 2011.

PINTO, J.E.B.P.; LAMEIRA, O.L. 2001. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE. 102p.

PRAKASH, C. S., VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee University. 1992, p. 27-37.

RIOS, J.F. **Micropropagação de *Gypsophila paniculata* pela cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de segmentos foliares**. 2004. 72p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. **Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro***. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 12, n.3, p. 333-340, 2010.

ROH, M. S; HALEVY A. H; WILKINS H. F. *Eustoma grandiflorum*. In: HALEVY A.H. (Ed.). **Handbook of Flowering**. Florida: CRC Press, 1989. p. 322-327.

SALMAN, M.N. Establishment of callus and suspension cultures from *Gypsophila paniculata* leaf segments and study of the attachment of host cells by *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophilae*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.189-196, 2002.

SALVADOR, E. D. **Caracterização física e formulação de substratos para o cultivo de algumas ornamentais**. 2000. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

SANI, L. A.; MUSTAPHA, Y. Effect of genotype and 2,4-D concentration on callogenesis in sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrids). **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, Kano, v. 3, n. 1, p. 238-240, 2010.

SCHULTHEIS, J. R.; CANTLIFFE, D. J.; CHEE, R. P. Optimizing sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] root and plantlet formation by selection of proper embryo developmental stage and size, and gel type for fluidized sowing. **Plant Cell Reports**, v.9, n. 7, p. 356-359, 1990.

SCHWENGBER, J. E.; RODRIGUES, A. C.; RUFATO, L. et al. Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação de microestacas do porta-enxerto de macieira cv. Mark. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 200-203. 1999.

SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 639-646, 1992.

STAFFORD, A.; WARREN, G. **Plant cell and tissue culture**. Melksham: Red Wood Press, 1991. 251p.

TIEL, K.; ENRÍQUEZ, G. A.; CEBALLO, Y.; SOTO, N.; FUENTES, A. D.; FERREIRA, A.; COLL, Y.; PUJOL, M. Development of a system for rapid plant

regeneration from in vitro sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología Aplicada**, v. 23, n. 1, p. 22-24, 2006.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, 509 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**, Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. República Federativa do Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. EMBRAPA. Brasília – DF. 2000.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – Serviço de Produção de Informação/Embrapa – CNPH. 1998. v. 1, p. 183 – 260.

UTOMO, H.S.; WENEFRIIDA, I.; MECHE, M.M.'NASHPLANT, J.L. Synthetic seed as a potential direct delivery system of mass produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.**, v.92, p.281–291, 2008.

VASIL, I. Automation in plant propagation. **Plant, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 39, n.2, p. 105-109, 1994.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, vol. 34(4): 507 - 511,2004.

WAGSTAFF, C.; ROGERS, H.; LEVERENTZ, M.; THOMAS, B.; CHANASUT, U.; STEAD, A. Characterisation of Alstroemeria vase life. **Acta Horticulturae**, v. 543, 161- 175, 2001.